

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
 INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
 PARIS

①⑪ N° de publication : 2 792 204

(à n'utiliser que pour les  
 commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 99 04610

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 48/00, A 61 K 38/17, A 61 P 31/18

⑫

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.04.99.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
 demande : 20.10.00 Bulletin 00/42.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
 recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
 présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
 apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
 RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement  
 public à caractère scientifique et technologique — FR.

⑦② Inventeur(s) : LORET ERWANN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ VACCIN ANTI-VIH-1 COMPRENANT TOUT EN PARTIE DE LA PROTEINE TAT DE VIH-1.

⑤⑦ La présente invention a pour objet un vaccin anti-VIH-  
 I comprenant tout ou partie de la protéine Tat de VIH-I. En  
 particulier la protéine Tat est celle du variant VIH-I Oyi.

FR 2 792 204 - A1



Best Available Copy

La présente invention a pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout  
5 ou partie de la protéine Tat de VIH-1.

L'objet de la présente invention concerne l'utilisation d'une protéine de  
régulation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la protéine Tat, comme  
vaccin contre ce virus. Tat est une protéine virale essentielle pour l'expression des  
gènes viraux et la réplication du virus VIH-1. Cette protéine permet l'activation  
10 des gènes du VIH-1 grâce à sa fixation sur une cible nucléotidique appelée TAR  
localisée à l'extrémité 5' des ARNm de VIH-1. Elle est sécrétée par les cellules  
infectées par le VIH et est indispensable pour une transcription reverse efficace de  
VIH-1. Une fois à l'extérieur de la cellule, elle est capable d'activer des cellules  
infectées éloignées et d'induire l'immunodéficience de cellules T non infectées. En  
15 outre, elle est directement impliquée dans des pathologies liées au SIDA, comme  
le sarcome de Kaposi.

La mise au point du vaccin contre le SIDA est très attendue au niveau  
planétaire mais l'obtention d'un vaccin contre le SIDA présente deux difficultés  
majeures. La première est liée à l'extrême variabilité de la protéine d'enveloppe  
20 GP120. La deuxième difficulté est due au fait que des anticorps anti-GP120  
semblent aggraver la maladie pour des patients ayant un SIDA déclaré. Toutefois  
des résultats préliminaires indique qu'un effet protecteur pourrait être possible  
avec des anticorps anti-GP120 chez des personnes n'étant pas contaminées au  
préalable. Une phase II avec un vaccin anti-GP120 a été lancée par la société  
25 Roche aux Etats Unis. Les cohortes sélectionnés pour cette phase II sont bien  
suivis au niveau médical. Il sera toutefois difficile d'obtenir une surveillance  
médicale équivalente lorsque le vaccin sera commercialisé.

Avec la GP120, Tat est la seule autre protéine du VIH détectée dans le  
sang de patients contaminés par le VIH-1. Les lymphocytes "tueurs" (CTL)

chargés d'éliminer toutes les cellules contaminées par un virus sont inhibés dans le cas du SIDA du fait de l'activité répresseur de la protéine Tat pour les gènes de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. Des anticorps anti-Tat (mais également des principes actifs ciblant Tat) devraient permettre la restauration de l'activité des CTL.

Tat est donc une cible privilégiée aussi bien pour le développement d'antiviraux anti Tat que pour une approche vaccinale.

La protéine Tat a donc déjà fait l'objet d'expérimentations. En particulier, des essais précliniques, obtenus avec une protéine Tat recombinante biologiquement inactive (Tat toxoïde), ont montré que l'immunisation chez des patients séronégatifs était sans danger (Le Buanec et al., 1998). Tat toxoïde entraîne, chez les patients séronégatifs une forte et persistante production d'anticorps anti-Tat. Chez des patients séropositifs et immunodéficients une augmentation significative du taux d'anticorps anti-Tat est observé par rapport au taux normal d'anticorps anti-Tat (Westendorp et al., 1995).

Cette Tat toxoïde est une protéine recombinante qui est rendue biologiquement inactive après la carboxyméthylation des cystéines de Tat. Les inventeurs ont pu produire également une Tat carboxyméthylée (Tat Bru cmC) et ils ont observé également une perte de l'activité de transactivation alors que le même variant Tat avec les cystéines libres (Tat Bru fC) est capable de transactiver. Tat Bru cmC est capable de se fixer sur TAR avec une affinité comparable à Tat Bru fC.

Un inconvénient majeur dans l'utilisation comme vaccin de Tat carboxyméthylée est que la modification chimique des cystéines entraîne un changement conformationnel que les inventeurs ont observé par dichroïsme circulaire et RMN. Bien que des changements conformationnels existent parmi les différents variants Tat, la carboxyméthylation des cystéines entraîne des modifications majeures dans le repliement de la chaîne peptidique de Tat qui, de ce fait, n'est pas un bon candidat pour la préparation d'un vaccin anti-Tat, en effet,

pour qu'un tel vaccin puisse être efficace, il faut que les anticorps puissent reconnaître une cible conservée chez les variants Tat.

Il convient par conséquent d'utiliser dans un vaccin anti-VIH-1 une protéine Tat défectueuse mais possédant les caractéristiques structurales similaires aux Tat fonctionnelles. Cette Tat devrait en effet présenter une structure conformationnelle la plus proche possible des protéines Tat naturelles, mais ne pouvant pas transactiver, c'est-à-dire, comme précédemment indiqué, incapable d'activer des cellules infectées éloignées et induire l'immunodéficience de cellules T non infectées. Il est en effet crucial d'inhiber cette immunodéficience.

La présente invention a donc pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie d'au moins une protéine Tat de VIH-1 capable de se fixer sur TAR et incapable de transactiver, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvant(s) de l'immunité approprié(s).

Ainsi, une protéine Tat peut être utilisée pour la préparation d'un vaccin conforme à l'invention mais également seulement une ou plusieurs partie(s) de cette protéine susceptible(s) de remplir les fonctions recherchées pour la protéine Tat dans le cadre de la présente invention. Le susdit vaccin peut également comprendre une combinaison de différentes protéines Tat ou encore des parties de protéines Tat différentes.

La protéine Tat susceptible d'être utilisée dans le vaccin conforme à l'invention doit donc être différente des protéines Tat fonctionnelles dites « naturelles », c'est-à-dire extraites de différentes souches de VIH-1 présentes à l'état naturel, de façon à être incapable de transactiver tout en se fixant sur TAR. C'est la raison pour laquelle, les Tat utilisées dans le vaccin conforme à l'invention présentent une séquence nucléotidique ayant au moins une mutation par rapport à la séquence nucléotidique d'une Tat fonctionnelle. Cette mutation, généralement ponctuelle, peut par exemple donner lieu à la suppression, l'ajout ou substitution d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s).

Dans le cadre de leurs travaux, les inventeurs ont tout d'abord cherché à obtenir des informations sur la structure de Tat. Les études structurales nécessitent des quantités importantes de protéines (10 à 15 mg) par rapport aux études virologiques (quelques  $\mu\text{g}$ ). Ils ont essayé de produire Tat par biologie  
5 moléculaire sans succès avant d'essayer la synthèse en phase solide en 1996. Le premier variant Tat qu'ils ont réussi à synthétiser provenait de la souche VIH-1 Bru dont la séquence comporte 86 résidus (Barre-Sinoussi et al., 1983). Grâce à ce succès ils ont pu commencer l'étude par RMN 2D de Tat Bru. L'assignement séquentiel des systèmes de spin était pratiquement impossible avec des spectres  
10 RMN du proton. Les inventeurs ont donc fait une nouvelle synthèse avec certains résidus de Tat possédant un carbone alpha marqué au  $^{13}\text{C}$ . Des spectres RMN 2D hétéronucléaires leur ont permis d'identifier 11 systèmes de spin sans ambiguïté et de pouvoir ainsi commencer un assignement séquentiel sur des bases solides. Ils ont ainsi pu déterminer un nombre considérable de contraintes RMN et ils ont  
15 maintenant une structure 3D de Tat Bru respectant 950 contraintes RMN. Grâce à cette structure 3D ils ont pu modéliser une famille de molécules qu'ils appellent TDS capable de se fixer sur une région cible conservée chez les variants Tat.

Afin de tester expérimentalement la fixation de dérivés TDS sur différents variants Tat, les inventeurs ont synthétisé cinq autres variants représentatifs  
20 chacun de la diversité structurale observée avec cette protéine (Grégoire et Loret, 1996) : Tat Z2 (86 résidus), Tat Mal (87 résidus), Tat Eli (99 résidus), Tat Oyi (101 résidus) et Tat Jr (101 résidus). 6 groupes structuraux parmi tous les isolats de VIH-1 ont ainsi été déterminés en fonction de la taille des protéines et de la nature de leurs mutations. Il était vraisemblable que tous ces variants avaient des  
25 activités pharmacologiques similaires à Tat Bru qui a été synthétisée deux fois, avec les cystéines carboxyméthylées (Tat Bru cmC) et ensuite avec les cystéines libres (Tat Bru fC). La chimie utilisée est de type fastFmoc avec l'activateur HBTU. La purification des protéines a été effectuée par chromatographie liquide

haute performance. Il s'est avéré que toutes ces protéines synthétiques sont capables de se fixer sur TAR mais de grandes disparités se sont révélées dans le test de transactivation sur cellule HeLa. Le résultat le plus surprenant fut l'absence de transactivation observée avec le variant Tat Oyi. Aucune transactivation n'a été observée non plus avec le dérivé Tat Bru possédant les cystéines carboxyméthylées. L'étude par dichroïsme circulaire (CD) en phase aqueuse de ces protéines synthétiques montre bien que la modification chimique de Tat Bru cmC a modifié de manière significative la structure de Tat Bru. Par contre Tat Oyi a une structure similaire aux autres comme l'atteste son spectre CD.

10 La souche VIH-1 Oyi a été identifiée chez un patient Gabonais à la fin des années 80 (Huet et al., 1989). Ce patient, bien que séropositif depuis plusieurs années, était en parfaite santé. Apparemment, le fait d'avoir une protéine Tat défectueuse dans cette souche VIH-1, a empêché l'évolution vers un SIDA chez ce patient et lui a conféré une immunité contre le virus du SIDA.

15 Par conséquent, la protéine Tat du variant VIH-1 Oyi semble être le meilleur candidat pour entrer dans la composition d'un vaccin anti-VIH-1. Le vaccin conforme à l'invention comprend donc, selon un mode de réalisation particulièrement intéressant, la Tat, en tout ou en partie, du variant VIH-1 Oyi.

20 La position de sept résidus cystéine (région 22-37) est très conservée parmi tous les variants Tat et l'importance des résidus cystéine pour la transactivation est largement décrite dans la littérature (Jeang, 1996)

Les inventeurs, par la détermination de la structure 3D de Tat Bru par RMN 2D hétéronucléaire, ont par ailleurs identifié une région cible qui devrait être conservée chez les variants Tat. Cette cible est constituée en partie par la région N-terminale et la région basique de la séquence de Tat. Ainsi, la présente invention a plus particulièrement pour objet un vaccin caractérisé par le fait qu'il comprend au moins la région N-terminale et par la région basique de la séquence de Tat correspondant respectivement aux régions 1-20 et 40-58 (selon la numérotation des acides aminés) en tout ou partie.

La structure 3D du variant Tat Bru montre que la région riche en cystéines est proche de l'espace tridimensionnel de la région N-terminale et de la région basique. Ceci indique que la carboxyméthylation des cystéines modifie probablement la structure de cette cible et confirme le fait que la Tat ainsi modifiée ne peut être considérée comme un candidat potentiel pour la préparation d'un vaccin anti-VIH.

Par ailleurs, les inventeurs ont réalisé la synthèse chimique en phase solide des différentes protéines Tat. Les avantages présentés par ce mode de synthèse résident dans les coûts de production moindres, les meilleurs rendements par rapport à la Tat produite par biologie moléculaire et l'absence de contaminations.

Ainsi, de manière avantageuse, la Tat mise en œuvre dans le vaccin conforme à l'invention est préparée par synthèse chimique et plus particulièrement par synthèse chimique en phase solide.

Enfin, afin d'éviter tout risque potentiel de toxicité du fait du passage de la protéine Tat, en particulier Tat Oyi, dans les membranes, il conviendrait de modifier la séquence Arg-Gly-Asp présente en C-terminal de la séquence de tous les variants Tat. Cette séquence est en effet essentielle pour le passage membranaire car elle reconnaît un récepteur membranaire à la surface des cellules (Jeang, 1996). Plus particulièrement, cette modification pourrait consister en la substitution de cette séquence par la séquence Lys-Ala-Glu ce qui n'aurait pas d'influence sur la structure, ou éventuellement par la séquence Ala-Ala-Ala.

## **FIGURES**

**Figure 1** : Comparaison des différentes protéines Tat.

Les protéines Tat ont été réparties en 6 groupes structuraux qui sont mentionnés en gras sur la Figure 1A et soulignés sur la Figure 1B.

**Figure 1A** : Séquences en acides aminés des protéines Tat.

TatZ2 provient d'un isolat de VIH-1 proche des souches ancestrales du

virus (Zhu et al., 1998). Tat Mal et Tat Eli proviennent d'une souche VIH-1 isolée pendant les années 80 en Afrique Centrale à l'occasion d'infections hétérosexuelles à VIH (Alizon et al., 1986). Tat Br comprend la séquence la plus utilisée en laboratoire et provient d'une souche VIH-1 isolée en France (Barre-Sinoussi et al., 1983), tandis que Tat Jr provient d'un isolat VIH-1 américain (O'Brien et al., 1990). Tat Oyi est étroitement apparenté à Tat Jr et Tat Bru mais provient d'une souche VIH identifiée chez un patient sein au Gabon (Huet et al., 1989).

**Figure 1B :** Classification des protéines Tat en fonction de leur taille et des mutations qu'elles comprennent pour le programme MULTALIN (Corpet, 1989).

**Figure 2 :** Séquence de la protéine Tat du variant VIH-Oyi (décrite par Huet et al, 1989)

**Figure 3 :** Purification des 6 variants Tat par chromatographie liquide haute performance en phase reverse avec colonne greffée C8 à 280 nm (voir Matériels et Méthodes pour la procédure expérimentale).

Pour chaque cadre, le tracé inférieur représente le résultat de la synthèse peptidique avant purification, tandis que le tracé supérieur représente le résultat de la synthèse après la dernière étape de purification. Tat Bru (A), Tat Jr (B), Tat Z2 (C), Tat Oyi (D), Tat Mal (E) et Tat Eli (F) ont été clivées à partir de la résine avec TFA. Après précipitation avec de l'éther de butyle méthyle, les protéines ont été dissoutes dans du Tampon TFA à 0,1 % (tracé inférieur dans chaque cadre). Pour chaque protéine, la purification a été effectuée avec 2 migrations HPLC sur colonnes Hybar Merk C8 (4,5 x 125 mm, débit 0,8 ml/min) semi-préparatives successives et ensuite les fractions pures ont été analysées (tracé supérieur de chaque cadre) et identifiées par spectrométrie de masse et par une analyse des acides aminés (données non montrées). Dans chaque cas, il s'avère que le pic



principal HPLC représente la séquence complète. Les pics entre 10 et 15 min représentent des dérivés de 50 résidus tandis que les pics proches de la fraction principale sont des dérivés avec 1 à 15 délétion(s) à partir de l'extrémité N-terminale. Les fractions hautement hydrophobes sont des dérivés avec un poids moléculaire élevé probablement dû aux chaînes latérales incomplètement déprotégées.

**Figure 4** : Mesure de la constance d'affinité des Tat synthétiques pour la cible nucléotidique TAR par électrophorèse (voir les tests de déplacement de mobilité électrophorétique dans Matériels et Méthodes).

La concentration protéique (ng/μl) est indiquée au sommet de chaque bande de gel. L'ARN libre ou complexé est identifié par *f* (pour free/libre) et *c* respectivement. La préparation du même ARN est utilisée pour la titration avec les 6 protéines. Un dérivé Tat Bru avec des cystéines carboxyméthylées (Bru CmC) a également été testé. Les constantes de dissociation à l'équilibre ( $K_d$ ) ont été mesurées directement à partir de tests de déplacement de mobilité électrophorétique. Les valeurs de  $K_d$  varient approximativement de 50 nM pour Tat Eli et Tat Mal à environ 140 nM pour Tat Oyi et Tat Jr. De plus, les inventeurs ont noté qu'au-delà de la variation des valeurs de  $K_d$ , les profils de liaison avec les diverses protéines sont quelques peu différents. Par exemple, des concentrations faibles de Tat Bru produisent un complexe simple bien résolu et ce n'est qu'avec des concentrations plutôt supérieures ( $> 4,5$  ng/μl) que des agrégats se forment et ne peuvent pas pénétrer dans les gels d'acrylamide. Au contraire, des complexes multimères sont aisément identifiés avec Tat Eli même à de faibles concentrations. On peut voir jusqu'à 3 bandes retardées avec Tat Eli, dans une moindre mesure avec Tat Jr. De tels effets ne sont pas observés avec des protéines plus courtes telles que Tat Bru et Tat Mal par exemple, ainsi qu'avec Tat Oyi qui est une protéine plus longue.

**Figure 5** : Test de transactivation des protéines Tat synthétiques sur cellule HeLa. Ces cellules sont transfectées par le LTR du VIH-1 auquel est associé un gène rapporteur LacZ. Le taux de protéine  $\beta$ -gal produit est proportionnel à la capacité de transactivation des différentes Tat synthétiques. Le LTR contient les séquences d'ADN en aval et en amont requises pour la transcription du VIH et TAR est présent au début de l'ARNm (Clavel et Charneau, 1994). Les cofacteurs cellulaires requis pour la transactivation du VIH sont présents dans les cellules HeLa. Sans Tat, il y a une expression basale de  $\beta$ -gal qui est indiquée comme contrôle (C). L'histogramme suivant montre la transactivation observée avec les différents variants de Tat utilisant 2 concentrations : 1  $\mu$ M (boîte gris clair) et 5  $\mu$ M (boîte gris foncé). Dans chaque case, Tat a été additionnée au tampon cellulaire et donc une expression de  $\beta$ -gal supérieure au contrôle signifie que la Tat synthétique est capable de traverser les membranes nucléaires et cytoplasmiques, de se lier à TAR et d'interagir avec des cofacteurs cellulaires. Seul Tat Bru cmC (donnée non montrée) et Tat Oyi sont déficientes dans cette expérimentation alors qu'elles se lient à TAR (Figure 1). Tat Mal et Tat Eli montrent un niveau de transactivation 3 à 4 fois supérieur à celui de Tat Bru. Tat Z2, le plus proche des protéines Tat ancestrales, présente un faible niveau de transactivation et l'évolution pourrait favoriser les isolats de VIH-1 avec une Tat plus efficace. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres tests de transfection utilisant la luciférase comme gène reporter et Tat Mal et Tat Eli à 1  $\mu$ M transactivaient bien le LTR à un niveau comparable à celui obtenu avec une Tat-pCMV transfectée (donnée non montrée). La gamme de concentrations utilisées dans les différentes expérimentations s'étend de 0,1  $\mu$ M à 10  $\mu$ M (donnée non montrée). A 0,1  $\mu$ M, seule Tat Eli montre un niveau de transactivation significativement supérieur au niveau de base. A 10  $\mu$ M, les 6 Tat montrent des niveaux de transactivation tellement élevés qu'il est impossible d'observer des différences entre elles en raison de la saturation.

**Figure 6** : Spectres dichroïques des variants Tat Z2 (triangle blanc), Tat Oyi (triangle noir), Tat Bru (cercle blanc), Tat Bru cmC (pas de marque), Tat Jr (cercle noir), Tat Mal (carré blanc) et Tat Eli (carré noir).

5 Les spectres sont mesurés en tampon phosphate à 20  $\mu$ M pH 4,5, ils sont enregistrés de 260 à 178 nm avec un trajet optique de 50  $\mu$ m. Les différences observées dans les spectres CD révèlent une hétérogénéité structurale entre les variants Tat quelle que soit leur taille. Il n'est pas possible de rassembler les spectres CD dans 2 catégories constituées des Tat courtes (marques blanches) et  
10 des Tat longues (marques noires). Les spectres CD sont caractérisés par une bande négative proche de 200 nm typique des structures non organisées. La magnitude intense de la bande de 200 nm observée avec Tat Bru cmC montre que la modification des cystéines a entraîné des changements conformationnels majeurs par rapport aux autres Tat.

15 La présente invention ne se limite pas à la description ci-dessus. Elle sera mieux comprise à la lumière des exemples qui ne sont mentionnés qu'à titre illustratif.

## 20 EXEMPLES / MATERIELS ET METHODES

### Synthèse protéique, purification et caractérisation

Des peptides ont été assemblés selon la méthode de Barany et Merrifield  
25 (1980) sur une résine préchargée de divinylbenzène de 4-hydroxyméthyl-phénoxy-méthyl-copolystyrène à 1 % (HMP) (0,5-0,65 mmol) (Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Forster City, CA) sur un synthétiseur automatisé (ABI 433A, Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Forster City, CA). De façon à éviter l'obtention de dérivés présentant des délétions, les extrémités N-terminales sans

Fmoc ont été protégées par un groupement acétyl après traitement par un mélange comprenant 4,75 % d'anhydride acétique (Merck), 6,25 % de DIEA à 2,0 M, 1,5 % de 1-hydroxybenzotriazol 1M (HOBt) (Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Warrington, GB) et 87,5 % de N-méthylpyrrolidone (Perkin Elmer, Forster City, CA). Chaque étape de déprotection a été contrôlée avec un dispositif de conductivité. Les peptides ont été déprotégés et retirés de la résine avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) complémenté avec 10 % de méthyl-phényl-sulphide (Merck) et 5 % d'éthane dithiol (Merck). La purification a été réalisée avec un appareil de chromatographie liquide à haute performance de Beckman (HPLC) et une colonne en phase reverse C8 de Merck (10 x 250 mm). Le Tampon A était constitué d'eau avec 0,1 % de TFA et le Tampon B était constitué d'acétonitrile avec 0,1 % de TFA. Le gradient était constitué de Tampon B de 20 à 40 % en 40 min et un débit de 2 ml/min. Une spectrométrie de masse par électrovaporisation a été réalisée avec un PE-SCIEX API 150ex simple quad de Perkin Elmer. Des analyses d'acides aminés ont été réalisées sur un analyseur de Beckman, modèle 6300.

#### Tests de déplacement de mobilité électrophorétique

Les 59 nucléotides de l'ARN de TAR contenant le renflement pyrimidine UUU essentiel a été préparé *in vitro* par transcription avec l'ARN polymérase T3. Les mélanges de réaction de liaison (20 µl) contenaient 0,2 nmole d'ARN de TAR radiomarké, 0-100 ng de Tat dans un Tampon TK (50 mM de Tris pH 7,4, 20 mM de KCl, 0,1 % de Triton X-100). Les complexes ont été séparés de l'ARN non lié par électrophorèse sur des gels dénaturants de polyacrylamide à 8 % contenant 0,1 % de Triton X-100. Le gel a été pré-migré pendant 30 min avant le chargement de l'échantillon (25 µl). L'électrophorèse s'est poursuivie pendant 90 min à environ 200 V. Les quantités relatives d'ARN libre et/ou lié ont été déterminées par imagerie au phosphore.

### Dichroïsme circulaire (CD)

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été mesurés avec un trajet optique de 50  $\mu$ m de 260 à 178 nm sur un spectrophotomètre CD UV de Jobin-Yvon (Long-Jumeau, FRANCE) (Mark VI). L'instrument a été calibré avec de l'acide (+)-10-camphorsulfonique. Un rapport de 2,1 a été trouvé entre la bande CD positive à 290,5 nm et la bande négative à 192,5 nm. Les données ont été collectées à 0,5 nm d'intervalle avec un taux de balayage de 1 nm par minute. Les spectres CD ont été reportés sous forme de  $\Delta\epsilon$  par amide. Les échantillons ont été préparés dans un tampon phosphate à 20 mM (pH 4,5). Les concentrations protéiques étaient comprises dans une gamme de 0,5 à 1 mg/ml.

### Transactivation avec des cellules transfectées par LTR de HIV

La transactivation fonctionnelle par une Tat synthétique a été déterminée en utilisant des cellules P4. Ces cellules CD4-HeLa portent le gène lacZ bactérien sous le contrôle de LTR de VIH et l'accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -galactosidase est strictement dépendante de la présence de Tat. 80 % des cellules confluentes étalées sur une plaque à 12 puits ont été incubées pendant 24 h à 37°C, en présence de CO<sub>2</sub> à 5 %, avec la protéine Tat comprise dans un milieu DMEM supplémenté avec 0,1 % de BSA. Suite à cette période d'incubation, les cellules ont été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate et les protéines ont été extraites et analysées pour la  $\beta$ -galactosidase avec un test d'immunoabsorption du commerce mettant en œuvre une enzyme liée à un antigène (ELISA pour  $\beta$ -galactosidase, Boehringer Mannheim, FRANCE), selon les instructions du fabricant. Les valeurs ont été normalisées au moyen de la concentration des protéines totales des différents lysats cellulaires comme déterminé par la méthode de Bradford.

### Phosphorylation *in vitro*

Des anticorps monoclonaux dirigés contre PKR (kinase induite par interféron et impliquée dans le système de défense cellulaire antiviral) ont été liés tout d'abord à de l'agarose-protéine A pendant 60 min à température ambiante (1  
5  $\mu$ l d'anticorps monoclonal pour 100  $\mu$ l d'agarose) dans un Tampon I (constitué de 20 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 40 mM de NaCl, 50 mM de KCl, du Triton-X100 à 1 %, 1 mM de EDTA, 0,05 % d'aprotinine, 0,2 mM de PMSF, 5 mM de 2-mercaptoéthanol et du glycérol à 25 %). Les structures en forme de billes ainsi formées ont été lavées trois fois dans du Tampon I et incubées avec des extraits  
10 cytoplasmiques issus de cellules de Daudi traitées avec l'interféron à 4°C pendant 20 h (extraits équivalents à  $10^6$  cellules pour 100  $\mu$ l de billes). Elles ont ensuite été lavées trois fois dans le Tampon I, lavées ensuite trois fois dans le Tampon II (constitué de 20 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 0,05 % d'aprotinine et du glycérol à 20 %) et resuspendues dans le Tampon III  
15 (constitué du Tampon II supplémenté avec 2 mM de  $MgCl_2$ ). Pour la réaction de phosphorylation, chaque échantillon (30  $\mu$ l de billes) a été incubé dans 40  $\mu$ l de Tampon III supplémenté avec 2 mM de  $MnCl_2$  et 10  $\mu$ l d'une solution de  $^{32}P$  g-ATP (1,25 mCi/ml  $^{32}PgATP$  (3000 Ci/mmeole ; ICN), 10 mM d'ATP, 1 mM de  $MgCl_2$  dans du Tampon II). La réaction a été réalisée en l'absence ou en la  
20 présence de 1  $\mu$ g/ml de poly(I)-poly(C) (Pharmacia). Après incubation pendant 15 min à 30°C, eIF2 $\alpha$  (2  $\mu$ l d'une préparation purifiée ; don de Christopher Proud) ou les différentes protéines Tat (0,2 à 0,4  $\mu$ g) ont été ajoutées et la réaction s'est poursuivie pendant encore 15 min. Toutes les protéines Tat provenaient de 100  $\mu$ g de protéines lyophilisées resuspendues dans un tampon phosphate à 100 mM, pH  
25 4,5, contenant 5 % de sérum albumine bovine. Pour le test de phosphorylation PKR, elles ont été diluées 10 fois dans du Tampon II supplémenté avec 2 mM de  $MgCl_2$  et de 2 mM de  $MnCl_2$  et ajoutées immédiatement au mélange d'incubation. A la fin de l'incubation, un volume égal à 2 fois le tampon d'électrophorèse de

protéine a été ajouté et les produits ont été analysés par SDS-PAGE sur des gels de polyacrylamide à 17,5 %.

## REFERENCES

- Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L., & Sonigo, P. (1986) *Cell* **46**, 63-74
- 5 Barany, G. & Merrifield, R.B. (1980) in Gross, E., & Meinhofer, J. (Eds) *The peptide : Analysis, Synthesis, Biology*. Academic Press, New York, Vol. 2, pp 1-284
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S.,  
10 Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983) *Science* **220**, 868-871
- Clavel, F. & Charneau, P. (1994) *J. Virol* **68**, 1179-1185
- 15 Corpet, F. (1989) *Nucl. Acid. Res.* **22**, 10881-10890.
- Grégoire, C. & Loret, E.P. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**, 22641-22646
- Huet, T., Dazza, M.C., Brun-Vezinet, F., Roelants, G.E. & Wain-Hobson, S.  
20 1989. *AIDS* **3**, 707-715
- Jeang, K.T. (1996) in Los Alamos National Laboratory (Ed) *HIV-1 Tat: Structure & Function*. Human Retroviruses & AIDS compendium. III, pp 3-18
- 25 Le Buanec, H., Lachgar, A., Bizzini, B., Zagury, J. F., Rappaport, J., Santagostino, E., Muca-Perja, M. & Gringeri, A. 1998. *Biomed. Pharmacother* **10**, 431-435



O'Brien, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A., Zhao, J.Q., Diagne, A., Idler, K.,  
Zack, J.A. & Chen, I.S. (1990) *Nature* **348**, 69-73

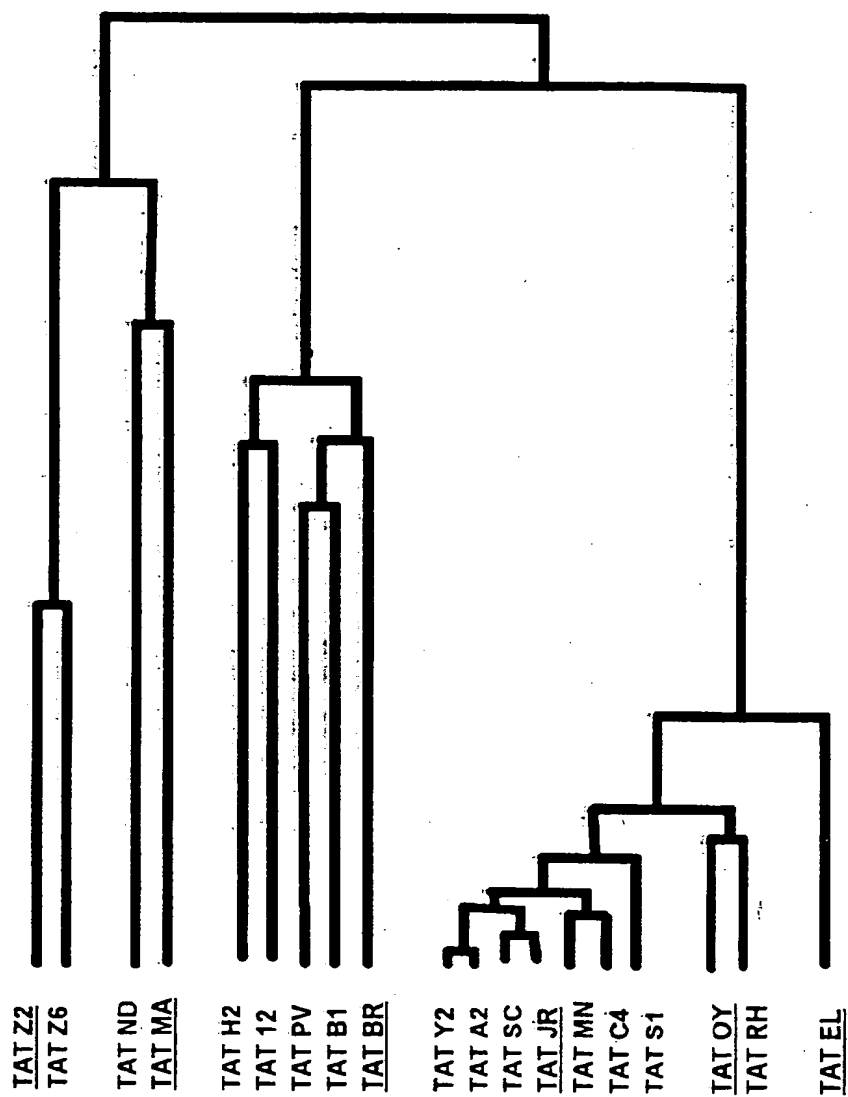
Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak,  
5 H., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. 1995. *Nature* **375**, 497-500

Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M. & Ho, D.D.  
(1998) *Nature* **391**, 594-597

### REVENDICATIONS

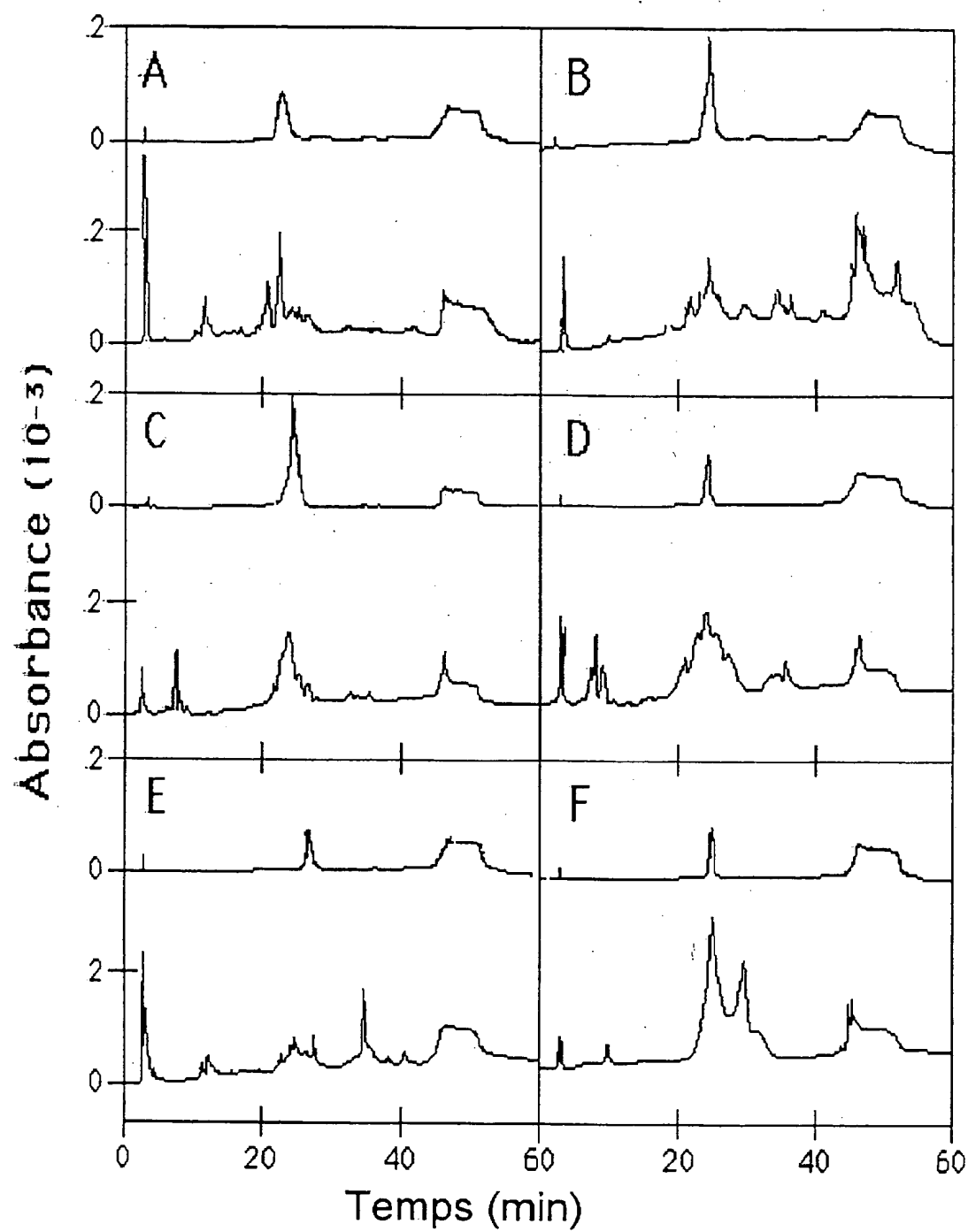
1. Vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie d'au moins une protéine Tat de VIH-1 capable de se fixer sur TAR et incapable de transactiver, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvant(s) de l'immunité approprié(s).
2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il s'agit d'une Tat dont la séquence nucléotidique présente au moins une mutation par rapport à la séquence nucléotidique d'une Tat fonctionnelle.
3. Vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait qu'il s'agit de la Tat du variant VIH-1 Oyi ou partie de cette Tat.
4. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait qu'il s'agit d'une Tat synthétique chimique.
5. Vaccin selon la revendication 4, caractérisé par le fait que la Tat est synthétisée en phase solide.
6. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins la région N-terminale et/ou la région basique de la séquence de Tat correspondant respectivement aux régions 1-20 et 40-58.
7. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que la région Arg-Gly-Asp située à l'extrémité C-terminale de Tat est modifiée.

**FIGURE 1A**

FIGURE 1B

H-Met-Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-His-Pro-  
Gly-Ser-Gln-Pro-Lys-Thr-Ala-Ser-Asn-Asn-Cys-Tyr-Cys-Lys-  
Arg-Cys-Cys-Leu-His-Cys-Gln-Val-Cys-Phe-Thr-Lys-Lys-Gly-  
Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-  
Arg-Ala-Pro-Gln-Asp-Ser-Lys-Thr-His-Gln-Val-Ser-Leu-Ser-  
Lys-Gln-Pro-Ala-Ser-Gln-Pro-Arg-Gly-Asp-Pro-Thr-Gly-Pro-  
Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Lys-Val-Glu-Arg-Glu-Thr-Glu-Thr-Asp-  
Pro-Glu-Asp-OH

**FIGURE 2**

**FIGURE 3**

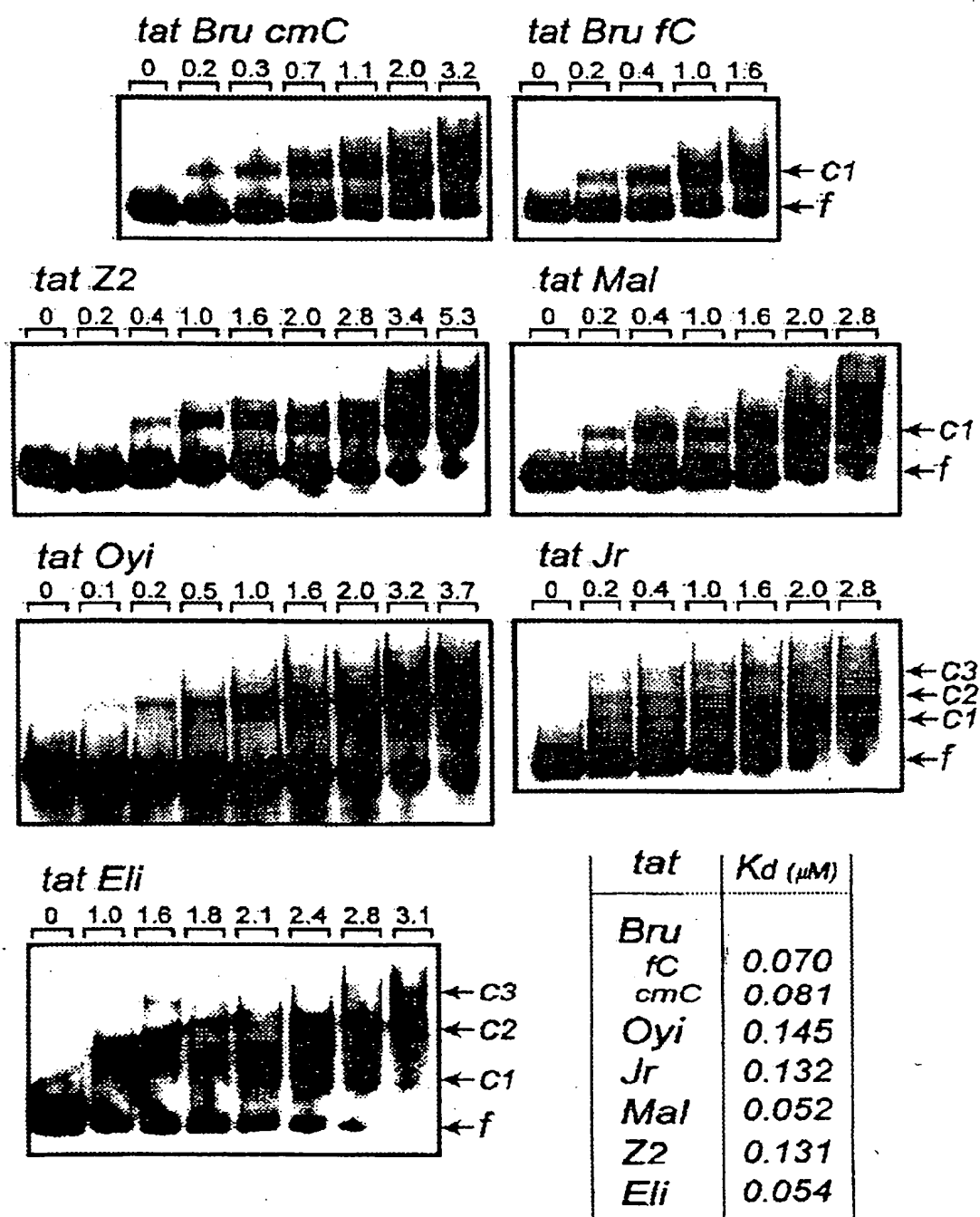
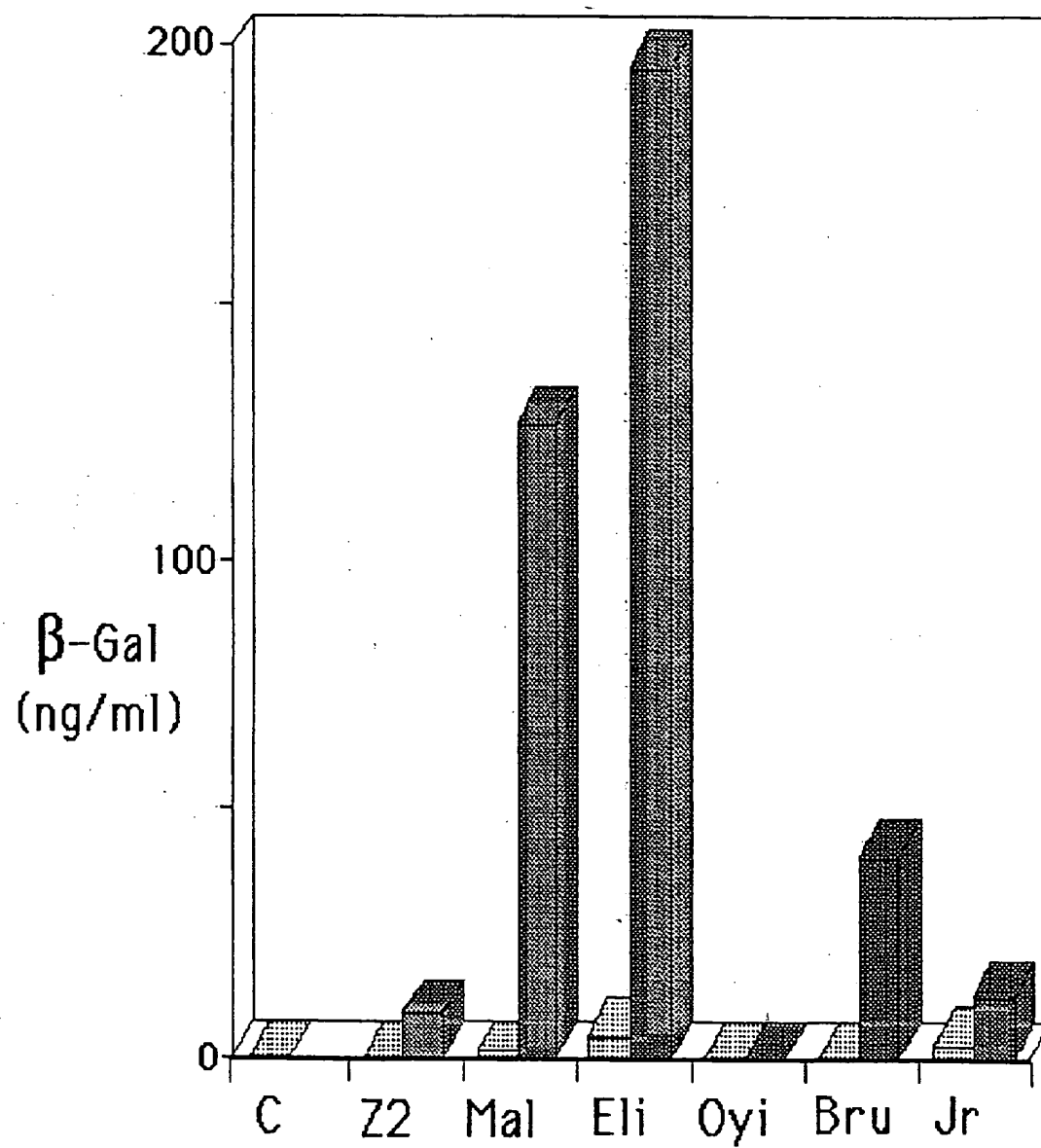
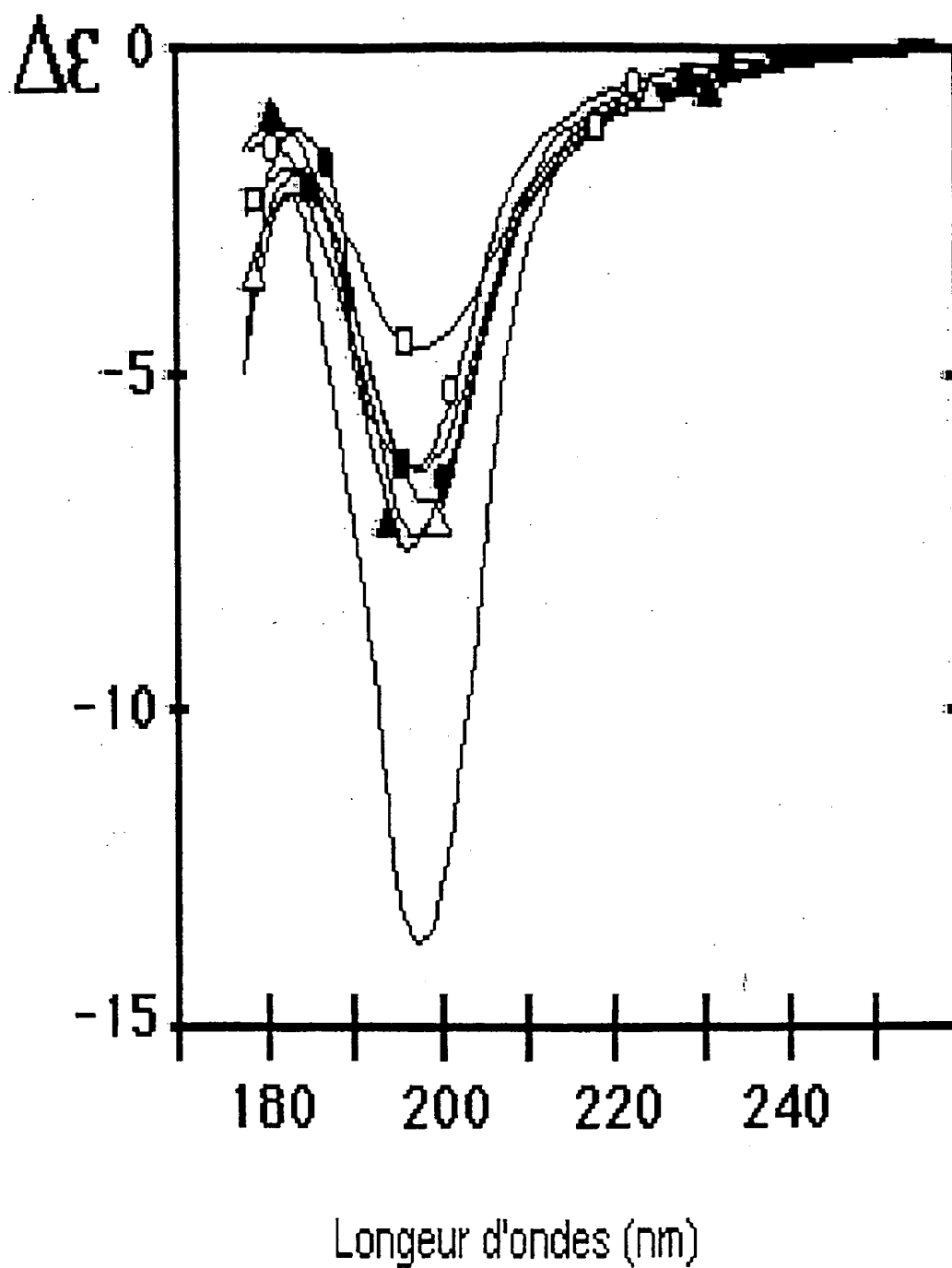


FIGURE 4

**FIGURE 5**



**FIGURE 6**

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 574043

FR 9904610

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A,D	T. HUET ET AL.: "A HIGHLY DEFECTIVE HIV-1 STARIN ISOLATED FROM A HEALTHY GABONESE INDIVIDUAL PRESENTING AN ATYPICAL WESTERN BLOT" AIDS, vol. 3, 1989, pages 707-715, XP000867752 * page 708, colonne 1, alinéa 1 * * page 712, colonne 2, alinéa 1 - alinéa 2 *	1-3,6,7
A,D	H. LE BUANEC ET AL.: "A PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC AIDS VACCINE CONTAINING AS A COMPONENT THE INNOCUOUS TAT TOXOID" BIOMED & PHARMACOTHER, vol. 52, 1998, pages 431-435, XP000867754 * le document en entier *	1,2
A	US 5 889 175 A (MEHTALI MAJID ET AL) 30 mars 1999 (1999-03-30) * colonne 1, ligne 5 - ligne 12; revendications 1,9-11; tableau 1 * * colonne 2, ligne 23 - ligne 37 * * colonne 3, ligne 1 - ligne 16 * * colonne 3, ligne 27 - ligne 35 * * colonne 3, ligne 48 - colonne 4, ligne 47 * * colonne 7, ligne 53 - colonne 8, ligne 15 *	1,2,6
A,D	GREGOIRE C J ET AL: "Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 SEP 13) 271 (37) 22641-6. , XP002129593 * page 22641, colonne 2, alinéa 1 - page 22642, colonne 1, alinéa 1 * * page 22645, colonne 1, alinéa 1 * --- -/--	1-4,6
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
2 février 2000		Charles, D
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

DOMAINES TECHNIQUES  
RECHERCHES (Int.CL.7)A61K  
C07K

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFA 574043  
FR 9904610

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes			
A	GOLDSTEIN G: "HIV - 1 Tat protein as a potential AIDS vaccine." NATURE MEDICINE, (1996 SEP) 2 (9) 960-4. REF: 34, XP002129594 * page 961, colonne 2, alinéa 1 - alinéa 2 * * page 963, colonne 1, alinéa 5 - colonne 2, alinéa 2 *	1		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)		
Date d'achèvement de la recherche 2 février 2000		Examineur Charles, D		
<table border="0"><tr><td><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</td><td>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</td></tr></table>			<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**